

WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07J 41/00, A61K 9/127, 48/00 // C07J

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 96/20208

A2

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

4. Juli 1996 (04.07.96)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE95/01879

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. December 1995

(28.12.95)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

(30) Prioritätsdaten:

P 44 46 937.3

28. December 1994 (28.12.94)

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESZKA, Regina [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ, Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(54) Title: NEW CHOLESTEROL DERIVATIVE FOR LIPOSOMAL GENE TRANSFER

(54) Bezeichnung: NEUES CHOLESTEROLDERIVAT FÜR DEN LIPOSOMALEN GENTRANSFER

(57) Abstract

The invention pertains to a new cholesterol derivative liposomal gene transfer. applicable in the fields of medicine and genetic engineering. The new cholesterol derivative 3β N-(N,N'-dimethylaminoethane)carbamoyl cholesterol (DAC-chol) is produced by reacting N,N'-dimethylethylenediamine chloroformyl cholesterol in equimolar amounts and is purified by chromatography. DAC-chol is nontoxic and can be used advantageously for direct liposomal gene transfer. The invention also pertains to new methods of direct liposomal gene transfer in vivo, characterized in that liposome-DNA complexes can be applied repeatedly using automatic or reprimable pump systems either continuously or with purposeful time intervals.

Cholesteryl chloroformat N-N'-Dimethylethylendiamin CHOLESTERYL CHLOROFORMATE N-N' DIMETHYLETHYLENE DIAMINE II

> 3β[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyi] cholestorol (DAC-Chol) 3BIN-(N, N'- DIMETHYLAMINOBTHANE) - CARBAMOYL CHOLESTEROL (DAC-CIM)

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik. Das neue Cholesterolderivat 3 β [N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol) wird durch Umsetzung von N,N'-Dimethylethylendiamin und Chlorformylcholesterol in äquimolaren Mengen hergestellt und durch Chromatographie gereinigt. DAC-Chol ist nicht toxisch und kann vorteilhaft für den direkten liposomalen Gentransfer eingesetzt werden. Gegenstand der Erfindung ist ferner eine neue Methode des direkten liposomalen Gentransfers in vivo, die dadurch gekennzeichnet ist, daß Liposomen/DNA-Komplexe kontinuierlich bzw. in gezielten Zeitintervallen über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme wiederholt appliziert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL.	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumlinien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
СН	Schweiz	u	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	ÜA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
Ft	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malewi	* 14	A MCCHANIL

1

Neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik.

Kationische Liposomen sind effektive nichtvirale Transfektionsreagentien für tierische Zellen in vitro (P. Felgner, G. Ringold, Nature 337/1989/, 387-388). Das erste Reagenz dieser Art, DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), ist nach Mischung mit einer äquimolaren Menge von DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin)in der Lage, eine Reihe von Säugerzellen in vitro und in vivo zu transfizieren.

Die Synthese von DOTMA verläuft über viele Stufen mit einer verhältnimäßig geringen Ausbeute. Das handelsübliche Mittel, Lipofektin, welches DOTMA und DOPE enthält, ist darüber hinaus relativ teuer. Andere kationische Liposomreagentien mit kommerziell zugänglichen kationischen Amphiphilen haben sich als relativ toxisch gegenüber den behandelten Zellen erwiesen (Pinnaduwage et al, Biochim. Biophys. Acta 285/1989/, 33-37).

X. Gao und L. Huang (Biochem. Biophys. Res. Comm. 179/1991/, 280-285) haben das kationische Cholesterolderivat 3B[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol(DC-Chol)beschrieben. Es kann in einer Stufe hergestellt werden, Liposomen mit diesem Lipid transfizieren effizienter und sind weniger toxisch gegenüber den behandelten Zellen als das Lipofektin-Reagenz.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues kationisches Lipid zu finden, das bei mit DC-Chol vergleichbarer Transfektionsfähigkeit eine geringere Toxizität aufweist und damit insbesondere für eine in vivo-Anwendung geeignet ist. WO 96/20208 PCT/DE95/01879

2

Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1 und 2 gelöst, das Herstellungsverfahren ist in Abbildung 1 formelmäßig dargestellt.

Das neue Mittel unter Einsatz von DAC-Chol hat gegenüber den bisher verwendeten Mitteln den Vorteil, bei hochsensiblen Zellen nicht toxisch zu sein und sowohl in vitro als auch in vivo zu erfolgreichen Transfektionen zu führen. Die Anwendung des Mittels wird an Giablastoma-Zellen der Ratte, die sonst nur mit geringer Effektivität transfiziert werden können, gezeigt. Es werden Transfektionsraten erreicht, die im Vergleich zur Calciumphosphat-Präzipitationstechnik (CPPT) bis zu 10fach höher sind. Dieser Befund dürfte auf ein kompaktere Formation der DNA, einen besseren Liposom-Zellkontakt über die positiven Ladungen der Vesikel und auf die höhere Stabilität in Hinsicht auf die DNA abbauenden Enzyme zurückzuführen sein.

Dadurch kann es vorteilhaft für den direkten liposomalen Gentransfer gemäß Anspruch 3 eingesetzt werden. So lassen sich z. B. auch Immunliposomen durch Kopplung von Organ- bzw. gewebespezifischen Antikörpern unter Zusatz von DAC-Chol/DOPE herstellen. Bei vorheriger Inkubation der zu transfizierenden DNA mit Kernproteinen (z. B. HMG-1) läßt sich eine erhöhte Integration und Expression des Fremdgens nach Verkapselung bzw. Assoziation in DAC-Chol/DOPE-Liposomen erreichen. Ein weitere Erhöhung der Aufnahme (Fusion) der DAC-Chol-Liposomen ist möglich, wenn man Fusionsproteine bzw. inaktivierte Viren in die Liposomenmembran rekonstituiert bzw. assoziiert.

Von Vorteil ist ferner, daß man diese Liposomen ohne nennenswerte Toxizitäten bzw. Immunreaktionen gemäß Anspruch 4 über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme zum direkten in vivo-Gentransfer (intratumoral bzw. Organ-spezifisch) verabreichen kann. Mit dieser Methode, die auch für andere Liposomen anwendbar ist, wird eine im Vergleich zu retroviralen bzw. adenoviralen in vivo-Methoden eine weit höhere Transfektionseffektivität erreicht. Damit können Tumorzellen, die sich in unterschiedlichem Maße zu einem bestimmten Zeitpunkt in Proliferation befinden, transfiziert und abgetötet werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

1. Herstellung von 3B(N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl)-cholesterol (DAC-Chol)

Die symmetrische Form von Dimethylethylendiamin wird nach der Vorschrift von Gao et al (Biochem. Biophys. Res. Comm. 179; 280) mit Chlorformylcholesterol umgesetzt. Das erhaltene ölige Produkt wird einer Säulenchromatographie (Silicagel 60, Laufmittel Trichlormethan/Methanol = 9:1) unterworfen. Das abgetrennte DAC-Chol besitzt nach der dünnschichtchromatografischen Reinigung (Laufmittel: Trichlormethan/Methanol = 65:35) einen Rf-Wert von 0,53-0,57.

Für die weitere Verwendung wird DAC-Chol mit DOPE im Verhältnis 3:2 gemischt.

2. Marker- und TNF-alpha-Gentransfer mit kationischen Liposomen in Vergleich zur Calciumphosphat-Präzipitationstechnik (CPPT) in vitro

Der Marker-Gentransfer führt zu einer vierfach höheren Transfektionsrate für kationische Liposomen als mit der CPPT-Methode. Die humanen Zellinien N64 und N31 zeigen beim Vergleich mit den üblichen Transfektionsmethoden (CPPT) eine 4-10fach höhere Transfektionsrate bei Verwendung von DAC-Chol/DOPE-Liposomen. Beim Einsatz von F98 Gioblastoma-Zellen von Ratten werden jedoch nur geringe Unterschiede beobachtet. Interessanterweise ist die Präparation gemäß der Erfindung trotz des aus dem DNA-Anteil resultierenden hohen Gehalt an DAC-Chol/DOPE-Liposomen nicht toxisch, was sowohl anhand von Vitalitätstesten (MTT) als auch an morphologischen Parametern nachgewiesen werden kann.

4

Tabelle 1
Maximale Transfektionseffizienz (aus 3 Experimenten, in % der transfizierten Zellen (5 x 10^5 , 5 μ g DNA (pBAG))

Transfektions methode	N31-Zellen	N64-Zellen	F98-Zellen
DC-Chol	1.26	2.00	1.06
Lipofectin	0.40	1.10	2.05
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0.12	0.52	0.76

Tabelle 2 hTNF Expression nach Gentransfer von F98 Zellen

Transfektionsmethoden	TNF Aktivität ng/ml von 5 x 10° Zellen, 24h
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,81 ± 0,29
DAC/Chol/DOPE	1,76 ± 0,3
Lipofectin	1,76 ± 0,29

Die Resultate sind ein Mittel aus 4 Experimenten + Standardabweichung. Der t-Test für unabhängige Proben zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der 3 Techniken.

Die hTNF-Sekretion nach dem Transfer mit den verschiedenen Methoden liegt zwischen 1-2 ng/ml. Die ausgeschiedene TNF-alpha Menge bewirkt eine deutliche Wachstumshemmung von F98-Zellen innerhalb von 5 Tagen. Die Wachstumshemmung wird von morphologischen Änderungen und vom Zelltod begleitet. F98-Zellen, die mit dem leeren (pWG29del3-)Vektor transfiziert wurden, exprimierten keine nachweisbaren Mengen von TNF und erwiesen sich als morphologisch intakt.

3. Die Stimulierung der TNF-alpha Expression von DAC-Chol-Liposomen durch Dexamethason

Tabelle 3

Dexamethason-stimulierte Expression von hTNF in transfizierten
Zellen

	Nr. des Zellklons Dexamethason (10 ⁻⁶ M/5h)	TNF Aktivität ng/ml 5 x 105/24 h	x fach
Lipofectin	10 -+	2.03 17.89	8.9
DAC-Chol/DOPE	5 - +	1.12 19.78	17.6
Transfectam	8 -	2.93 15.34	5.3

Dexamethason kann die hTNF-Produktion in F98 Zellklonen, gewonnen nach Transfektion mit DAC-Chol-Liposomen, bis zum 18fachen steigern. Ausgehend von den vorhergehenden Ergebnissen werden kationische DAC-Chol-Liposomen für den in vivo-Marker Gentransfer ausgewählt.

4. LacZ Gentransfer mit DAC-Chol/DOPE Liposomen in vivo

Nach dem in vivo-Marker Gentransfer mittels DAC-Chol-Liposomen in implantierte Rattentumore (F98, 6 μ g LacZ/10 μ l DAC-Chol/DOPE) konnte nachgewiesen werden, daß diese Liposomen beim direkten Gentransfer in der Lage waren, bis zu 3 Zellschichten um die Injektionsebene herum zu transfizieren (gemessen an einer positiven X-Gal-Färbung). In normalem Hirngewebe konnte dagegen keine Färbung durch endogene ß-Galactosidase nachgewiesen werden.

Patentansprüche

- 1. 3B[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol(DAC-Chol)
- 2. Verfahren zur Herstellung von DAC-Chol, dadurch gekennzeichnet, daß N,N'-Dimethylethylendiamin und Chlorformylcholesterol in äquimolaren Mengen miteinander umgesetzt werden und das erhaltene Produkt durch Chromatographie gereinigt wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung säulenchromatographisch mit Silicagel und dem Fließmittel Trichlormethan/Methanol 9:1 und nachfolgend dünnschichtchromatographisch mit dem Fließmittel Trichlormethan/Methanol 65:35 erfolgt
- 4. Verwendung von DAC-Chol für den direkten liposomalen Gentransfer in vivo, ggf. unter Verwendung von Antikörpern, u. a. zur Herstellung von Immunliposomen, von viralen Fusionsproteinen und von Kernproteinen (Nichthistonproteinen) wie HMG-1.
- 5. Direkter liposomaler Gentransfer in vivo, dadurch gekennzeichnet, daß man Liposomen/DNA-Komplexe kontinuierlich bzw. in gezielten Zeitintervallen über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme wiederholt appliziert.

Cholesteryl chloroformat

N-N'-Dimethylethylendiamin

3B[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl] cholesterol (DAC-Chol)

Cholesteryl chloroformat

N-N'-Dimethylethylendiamin

3ß[N-(N,N '-Dimethylaminoethan)-carbamoyl] cholesterol (DAC-Chol)

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07J 41/00, A61K 9/127, 48/00 // C07J 9/00

A3

- (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/20208
- (43) Internationales
 Veröffentlichungsdatum:

4. Juli 1996 (04.07.96)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE95/01879

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. December 1995 (28.12.95)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten: P 44 46 937.3

28. December 1994 (28.12.94) DE

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESZKA, Regina [DE/DE];
Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ, Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DF)

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:
6. September 1996 (06.09.96)

(54) Title: NEW CHOLESTEROL DERIVATIVE FOR LIPOSOMAL GENE TRANSFER

(54) Bezeichnung: NEUES CHOLESTEROLDERIVAT FÜR DEN LIPOSOMALEN GENTRANSFER

(57) Abstract

invention pertains The to a new cholesterol derivative for liposomal gene transfer, applicable in the fields of medicine and genetic engineering. new cholesterol derivative 3β N-(N,N'-dimethylaminoethane)carbamoyl cholesterol (DAC-chol) reacting produced by N,N'-dimethylethylenediamine and chloroformyl cholesterol in equimolar amounts and is purified chromatography. by DAC-chol is nontoxic and can be used advantageously for direct liposomal gene transfer. invention also pertains to new methods of direct liposomal gene transfer in vivo, characterized in that liposome-DNA complexes can be applied repeatedly using automatic or reprimable pump systems either continuously or with purposeful time intervals.

3β[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl] cholesterol (DAC-Chol)
3β[N-(N,N'-DIMETHYLAMINOETHANE)-CARBAMOYL] CHOLESTEROL (DAC-Chal)

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neues Cholesterolderivat für den liposomalen Gentransfer. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik. Das neue Cholesterolderivat 3 β [N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol) wird durch Umsetzung von N,N'-Dimethylethylendiamin und Chlorformylcholesterol in äquimolaren Mengen hergestellt und durch Chromatographie gereinigt. DAC-Chol ist nicht toxisch und kann vorteilhaft für den direkten liposomalen Gentransfer eingesetzt werden. Gegenstand der Erfindung ist ferner eine neue Methode des direkten liposomalen Gentransfers in vivo, die dadurch gekennzeichnet ist, daß Liposomen/DNA-Komplexe kontinuierlich bzw. in gezielten Zeitintervallen über automatische oder nachfüllbare Pumpsysteme wiederholt appliziert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	1E	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumanien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	КР	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	u	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swaziland
CN	China	LK	Litauen	TD	Techad
cs	Techechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Techechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dinemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
m	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Prankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

internamonal Application No. PC1, DE 95/01879

A. CLASS IPC 6	IFICATION OF SUBJECT MATTER C07J41/00 A61K9/127 A61K48/00	//C07J9/0	0
A	to international Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC	
	S SEARCHED		
Minimum d	documentation searched (classification system followed by classification CO7J A61K	n symbols)	
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that su	ch documents are include	d in the fields searched
Electronic	data base consulted during the international search (name of data base	and, where practical, sea	rch terms used)
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rel	evant passages	Relevant to claim No.
Υ	US,A,5 283 185 (EPAND RICHARD M February 1994 see the whole document	ET AL) 1	1-5
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEA COMMUNICATIONS, vol. 179, no. 1, 30 August 1991, FL US, pages 280-285, XP000572654 X. GAO & L. HUANG: "A novel catiliposome reagent for efficient transfection of mammalian cells" cited in the application see the whole document	ORLANDO,	1-5
X Fu	rther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family me	mbers are listed in annex.
'A' docu cons 'E' earlie film 'L' docu cutat 'O' docu	ment defining the general state of the art which is not adered to be of particular relevance or document but published on or after the international g date	or priority date and cited to understand invention "X" document of particul cannot be considered inventive an inventive arrivative and the considered cannot be considered to complete the constant of the considered to considered the constant of the considered to constant the constant of the constant o	thed after the international filing date not in conflict with the application but the principle or theory underlying the ar relevance; the claimed invention of novel or cannot be considered to step when the document is taken alone ar relevance; the claimed invention d to involve an inventive step when the ed with one or more other such docutation being obvious to a person skilled of the same patent family
Date of the	ne actual completion of the international search 14 June 1996		1. 07. 96
	d mailing address of the ISA	Authorized officer	
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Ripswijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Moreno,	С

1

International Application No PC'1, JE 95/01879

		PC1, JE 95/018/9	
C.(Continua	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
-	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 1, January 1994, NEW YORK US, pages 289-299, XP000450213 A. SINGHAL & L. HUANG: "Direct gene transfer by liposomes" see the whole document	1-5	
	-		
	•		

International application No. PCT/DE 95/01879

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)
This inter	rnational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
2.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 5 relates to a method of treatment of the human or animal body (diagnostic procedure carried out on the human or animal body), the search was completed, based on the alleged effects of the compound and composition. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This inte	rnational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark	on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

ormation on patent family members

Internation No PC : DE 95/01879

Patent document cited in search report			family per(s)	Publication date	
US-A-5283185	01-02-94	AU-B- AU-B- CA-A- EP-A- JP-T- WO-A-	665029 2656592 2116676 0663013 7500963 9305162	14-12-95 05-04-93 18-03-93 19-07-95 02-02-95 18-03-93	

Internamentes Aktenzeichen PC1, DE 95/01879

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07J41/00 A61K9/127 A61K48/00 //C07J9/00 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindesprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 CO7J A61K Recherchierte aber nicht zum Mindestprufstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. Kategone* 1-5 US.A,5 283 185 (EPAND RICHARD M ET AL) γ 1.Februar 1994 siehe das ganze Dokument 1-5 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH Y COMMUNICATIONS, Bd. 179, Nr. 1, 30.August 1991, ORLANDO, FL US, Seiten 280-285, XP000572654 X. GAO & L. HUANG: "A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -/--Siche Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen und der Fortsetzung von Feld C zu X T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeddedatum oder dem Priontätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist. Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutzam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Ammeldedamm veröffentlicht worden ist 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung micht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit berühend betrachtet werden. Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhaft er-schanen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdahum einer Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenischer Tätigkeit berühend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahcliegend ist anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden -ysoll oder the aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedaum, aber nach '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 0 1. 07. 96 14.Juni 1996

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Fax (+31-70) 340-3016

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

1

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno. C

Internamonales Aktenzeichen
PC 1, DE 95/01879

		PC:, DE 95/01879	
	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	nden Tale	Betr. Anspruch Nr.
-	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, Bd. 4, Nr. 1, Januar 1994, NEW YORK US, Seiten 289-299, XP000450213 A. SINGHAL & L. HUANG: "Direct gene transfer by liposomes" siehe das ganze Dokument		1-5

I nationales Aktenzeichen

PCT/DE95/01879

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt I)
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 5 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/ tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird,) bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und grün- dete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung und Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Die meningmene Gemeinenengen im 1998-1997 am ann and and and and and and and and and
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen binsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichu , die zur seiben Patentfamilie gehören

Internacionales Aktenzeichen PC ., DE 95/01879

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokurnent			l(er) der familie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5283185	01-02-94	AU-B- AU-B- CA-A- EP-A- JP-T-	665029 2656592 2116676 0663013 7500963	14-12-95 05-04-93 18-03-93 19-07-95 02-02-95
		WO-A-	9305162	18-03-93